

(Translation)



PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: April 11, 2000

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 2000-109954

Applicant(s): RIKEN  
Katsuhiko MIKOSHIBA

March 9, 2001

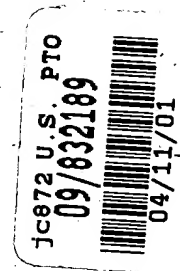
Commissioner,  
Patent Office

Kozo OIKAWA (seal)

Certificate No. 2001-3018180

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年 4月11日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-109954

出 願 人  
Applicant(s):

理化学研究所  
御子柴 克彦

2001年 3月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3018180

【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH11-060N

【提出日】 平成12年 4月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明の名称】 トランケート型リーリントンパク質およびそれをコードするDNA

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 東京都三鷹市井の頭2-19-25

【氏名】 御子柴 克彦

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市花見川区幕張町4-544-14 幕張四丁目団地3-405

【氏名】 田畑 秀典

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区前野町6-24-2-205

【氏名】 仲嶋 一範

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 392017978

【氏名又は名称】 御子柴 克彦

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100098121

【弁理士】

【氏名又は名称】 間山 世津子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランケート型リーリントタンパク質およびそれをコードする DNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リーリントタンパク質の F-spondin ドメインおよび CR-50 認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリントタンパク質。

【請求項 2】 アフリカツメガエルまたはマウスに由来する請求項 1 記載のトランケート型リーリントタンパク質。

【請求項 3】 以下の (a) または (b) のいずれかである請求項 2 記載のトランケート型リーリントタンパク質。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリントタンパク質の活性を有するタンパク質

【請求項 4】 以下の (a) または (b) のいずれかである請求項 2 記載のトランケート型リーリントタンパク質。

(a) 配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリントタンパク質の活性を有するタンパク質

【請求項 5】 リーリントタンパク質の F-spondin ドメインおよび CR-50 認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリントタンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】 アフリカツメガエルまたはマウスに由来する請求項 5 記載の DNA。

【請求項 7】 以下の (a) または (b) のいずれかであるトランケート型リーリントタンパク質をコードする請求項 6 記載の DNA。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換

若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【請求項 8】 以下の(a)～(c)のいずれかである請求項 7 記載の DNA。

(a) 配列番号 1 の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1 の塩基配列の1456番～2273番の塩基の配列を有する核酸プローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質をコードする DNA

(c) (a)または(b)の DNA の塩基配列と縮重関係にある塩基配列を有する DNA

【請求項 9】 以下の(a)または(b)のいずれかであるトランケート型リーリンタンパク質をコードする請求項 6 記載の DNA。

(a) 配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【請求項 10】 以下の(a)～(c)のいずれかである請求項 9 記載の DNA。

(a) 配列番号 3 の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 3 の塩基配列の2053番～2758番の塩基の配列を有する核酸プローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質をコードする DNA

(c) (a)または(b)の DNA の塩基配列と縮重関係にある塩基配列を有する DNA

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リーリンタンパク質のトランケート型アイソフォームおよびそれをコードする DNA に関する。

【0002】

【従来の技術】

中枢神経系の発生過程においては、脳室側で誕生した神経芽細胞はその発生運命に従って定められた場所へ移動し、最終分化を果たす。このとき、どのような

仕組みで神経芽細胞が自分の移動すべき場所を認識しているのかが問題となる。この仕組みを研究する上で非常に有用な突然変異マウスとしてリーラーが古くから知られている。リーラーでは神経芽細胞が正しい場所に移動できず、大脳、小脳、海馬等、中枢神経系のあらゆる場所において神経細胞の位置異常が認められる。リーラーで欠損している分子を同定するため、我々はリーラーに対して正常マウスの胎児脳を免疫し、モノクローナル抗体、CR-50を得た (Neuron 14,899-912(1995))。CR-50抗原は大脳ではCajal Retzius細胞に局限して発現していた。その後、リーラーの原因遺伝子としてreelinがクローニングされた (Nature 374,719-723(1995), Genomics 26,543-549(1995), Nature Genetics 10,77-82(1995))。ReelinはN末端側にF-spondinとある程度の相同性を示すF-spondinドメインをもち、ヒンジ領域を挟んでC末端側にはReelinタンパク質の大部分を占める8個のReelin repeatをもつ巨大な細胞外タンパク質であった (Nature 374,719-723(1995))。Reelin repeatの各リピート内にはEGF様モチーフがあり、このことからReelinタンパク質は細胞外基質(ECM)としての性質を持つことが予想されている。CR-50抗原はReelinそのものであり、さらにCR-50はin vitro、in vivoの両方でReelinの機能を阻害できることが明らかとなった (J. Neurosci.,17,23-31(1997), Nature 385,70-74(1997), J. Neurosci.,17,3599-3609(1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94,8196-8201(1997))。CR-50の認識部位はF-spondinドメインとReelin repeat Iの間にあることが確定している (J. Neurosci.,17,23-31(1997))。

#### 【 0 0 0 3 】

以上のような背景から、ReelinのN末端部は、Reelinの機能と直結する部位であり、一方Reelin repeatはReelinタンパク質をECM様分子としてCajal-Retzius細胞などのReelin産生細胞の近傍に留め、より局限したシグナルを付与するものと考えられた。

#### 【 0 0 0 4 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、大脳では層構造が観察されない両生類におけるReelin (以下、「リーリン」と記す。) タンパク質の存在を確認することを目的とする。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、アフリカツメガエル (*Xenopus*) のリーリン相同分子のクローニングを行い、その過程で選択的スプライシングによって産生されるトランケート型アイソフォームの存在を明らかにした。このアイソフォームは F-spondin ドメインと CR-50 認識部位を持つが、Reelin repeat (以下、「リピート部位」と記す。) は一つも持たない分子であった。さらに、本発明者らは、このタイプのアイソフォームがマウスにも存在することを明らかにした。これらのアイソフォームはリピート部位を含まないことから、ECM 様分子という性質は持たず、むしろより遠くに拡散する液性因子としての役割を持つことが考えられる。本発明は、上記の知見に基づいて完成された。

【 0 0 0 6 】

本発明の要旨は以下の通りである。

- (1) リーリンタンパク質の F-spondin ドメインおよび CR-50 認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリンタンパク質。
- (2) アフリカツメガエルまたはマウスに由来する (1) 記載のトランケート型リーリンタンパク質。
- (3) 以下の (a) または (b) のいずれかである (2) 記載のトランケート型リーリンタンパク質。
  - (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質
  - (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【 0 0 0 7 】

- (4) 以下の (a) または (b) のいずれかである (2) 記載のトランケート型リーリンタンパク質。
  - (a) 配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質
  - (b) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有



するタンパク質

【0008】

(5) リーリンタンパク質のF-spondinドメインおよびCR-50認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリンタンパク質をコードするDNA。

(6) アフリカツメガエルまたはマウスに由来する(5)記載のDNA。

(7) 以下の(a)または(b)のいずれかであるトランケート型リーリンタンパク質をコードする(6)記載のDNA。

(a)配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【0009】

(8) 以下の(a)～(c)のいずれかである(7)記載のDNA。

(a)配列番号1の塩基配列を有するDNA

(b)配列番号1の塩基配列の1456番～2273番の塩基の配列を有する核酸プローブとストリンジントな条件下で(例えば、5xSSPE、50%ホルムアミド存在下で42℃(但し、20xSSPE=3 M NaCl、173 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、25 mM EDTA))ハイブリダイズし、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA

(c)(a)または(b)のDNAの塩基配列と縮重関係にある塩基配列を有するDNA

【0010】

(9) 以下の(a)または(b)のいずれかであるトランケート型リーリンタンパク質をコードする(6)記載のDNA。

(a)配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号4のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【0011】

(10) 以下の(a)～(c)のいずれかである(9)記載のDNA。

(a) 配列番号 3 の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 3 の塩基配列の 2053 番～2758 番の塩基の配列を有する核酸プローブとストリンジェントな条件下で（例えば、5xSSPE、50%ホルムアミド存在下で 42℃（但し、20xSSPE=3 M NaCl、173 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25 mM EDTA））ハイブリダイズし、かつリーリントタンパク質の活性を有するタンパク質をコードする DNA

(c) (a) または (b) の DNA の塩基配列と縮重関係にある塩基配列を有する DNA

【 0 0 1 2 】

本明細書において、「リーリントタンパク質」とは、リーラー突然変異マウスの原因遺伝子で、シグナルペプチド、F-spondin ドメイン、CR-50 認識部位、リーリンリピートを含む細胞外基質タンパク質をいう。

「F-spondin ドメイン」とは、リーリントタンパク質の N 末端側において、F-spondin との間に相同性が認められる領域をいう。

【 0 0 1 3 】

「CR-50 認識部位」とは、マウスのリーリントタンパク質において、CR-50 抗体の認識する部位、または他の生物のもつリーリントタンパク質においては、マウスリーリンの CR-50 認識部位と相同な領域をいう。なお、CR-50 抗体は、Neuron 14,899-912(1995)に記載の方法により作製することができる。

「リピート部位」とは、リーリントタンパク質の C 末端側において、中心に EGF 様モチーフをもつ互いに相同性のあるアミノ酸配列の単位が連続して繰り返される領域をいう。

【 0 0 1 4 】

「リーリントタンパク質の活性」には、リーリントタンパク質が有するいかなる生物学的および免疫学的作用も含まれるが、その一例として、神経細胞を正しい位置に配置させる機能を挙げることができる。この機能は、Nature 385,70-74(1997), J. Neurosci., 17,3599-3609(1997), Proc. Natul. Acad. Sci. USA, 94,8196-8201(1997)に記載の方法により確認することができる。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】

リーリンは脳においては正常な層構造を形成する上で不可欠な分子である。

両生類の脳では層構造は観察されないが、このような動物にもリーリン分子が存在するのかどうかを明らかにするため、アフリカツメガエルリーリンの探索を行った。

## 【0016】

縮重プライマーによるPCRの結果、アフリカツメガエルリーリン(Xreelin)のPCR断片を得ることができた。驚いたことに、3'-RACEによる解析から、XreelinにはN末端側に位置するF-spondinドメインとヒンジ領域のほとんどの部分を含むが、リピート部位を一つも持たないスプライシング変異体が存在することが明らかとなった。完全型のXreelinおよびトランケート型のXreelinはともに尾芽胚期(st.28)に発現が開始され、その後成体になるまで継続して発現していた。ノーザンブロット解析を行った結果、完全型の転写産物はマウスと同じように約1.2 kbのものであった。トランケート型は、3~4 kbの位置にバンドが確認された。in situ hybridization法により、完全型の転写産物は尾芽胚期の嗅球と視蓋の原基に検出され、オタマジャクシの時期(st.47)になってからは小脳における発現も確認された。これらの結果は概ねマウスと一致するものであった。しかし、脳における発現は観察されず、このことはXenopusの脳に層構造が無いことと対応していた。

## 【0017】

本発明のトランケート型リーリントタンパク質には、リーリントタンパク質の約85%を占めるReelin repeatが無い。Reelin repeatはEGF様モチーフをもつ配列が8回くり返して現われる領域であり、他のEGF様モチーフをもつ細胞外基質分子との結合が示唆されている。このことから、Reelin repeatはリーリントタンパク質を細胞外基質に留めるために必要な領域であり、このリピート部位の無いトランケート型アイソフォームは生体内でより遠くまで拡散すると考えられる。

## 【0018】

例えば、本発明のトランケート型リーリントタンパク質をコードするcDNAを発現ベクターに組み込み、これを患者の組織に由来する神経芽細胞、神経幹細胞等に導入し、この細胞を患者の脳に移植することにより、神経細胞の配置異常による滑脳症、多小脳回症、異所性灰白質等の疾患の治療を行うことができる。

【 0 0 1 9 】

## 【実施例】

本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例 1】 アフリカツメガエル・リーリン (Xreelin) のクローニング  
方法

35期(Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. (1967) in Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), (North-Holland Publishing Company, Amsterdam).) アフリカツメガエル全胚から精製した全RNAより、Super Script II (Gibco BRL) を用いてランダムにプライミングしたcDNAを合成し、これを縮重プライマーを用いたPCRにかけた。一対の縮重プライマー (5'-A(A/G)TT(T/C)GGIAA(T/C)CA(A/G)TT(T/C)ATGTG-3' (配列番号 5) および 5'-TG(T/C)TCICCCAT(T/C)CA(A/G)TT-3' (配列番号 6)) を用いて、図 1 に示す塩基配列の362~696に対応するXreelinのPCR断片を得た。このPCR産物のより上流に位置する配列を得るため、5' RACE (5'-rapid amplification of cDNA end)を実施した。35期アフリカツメガエル全胚から単離した全RNAより、Fast Track 2.0キット(Invitrogen)を用いてPoly(A)+RNA を精製した。後の手順は、Gibco 5' RACEシステムver.2 (GC rich protocol, Gibco BRL) を用いて実施した。第1鎖の合成は、遺伝子特異的プライマー (5'-ATGTCCTCACTGGAAAGATC-3' (配列番号 7)) を用いてプライミングした。第2鎖合成反応の精製産物にAテールを付し、AUAPプライマー(Gibco BRL) および遺伝子特異的プライマー (5'-CAGCAACACATAGGGGACAA-3' (配列番号 8)) を用いてPCRを実施した。また、3' RACEシステム(Gibco BRL) を用いて3' RACE (3'-rapid amplification of cDNA end)を実施した。オリゴヌクレオチド (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGAATTCATCTATAGC(T)<sub>17</sub>-3' (配列番号 9)) を用いて、Super Script II によって、35期アフリカツメガエル全胚の全RNAより第1鎖cDNAを生成した。その配列が(T)<sub>17</sub>を除いた上記のオリゴヌクレオチドに相補的であるアダプタープライマー、および遺伝子特異的プライマー (5'-CAGTGTCTGTTGCTTCCCACGTGAGTCATCTTCCCA-3' (配列番号 10)) を用いてPCRを実施した。このPCR産物を、上記アダプタープライマーおよびネステド (nested) 遺伝子特異的プライマー (5'-CGACAGGTACAGG

ATGTGTCAACTTCATGGCCACA-3' (配列番号 11)) を用いてさらに増幅した。この工程から単一バンドが得られ、これを pGEM-T Easy ベクター (Promega) にクローン化した。このクローンの配列決定をすることによって、選択的スプライシングによって生成されたトランケート型アイソフォームを同定した。cDNA ライブラリーのスクリーニングによって、完全型に特異的な配列が解明された。Fast Track 2.0 キットを用いて 56 期 アフリカツメガエル・オタマジャクシ より調製した Poly(A)+RNA を、オリゴ(dT)<sub>12-18</sub> およびランダムヘキサマーと共に第 1 鎖の合成に使用した。合成した cDNA を  $\lambda$  ZapII ファージベクター (Stratagene) に連結した。図 1 に示す塩基配列のヌクレオチド 414 ~ 1253 に対応する <sup>32</sup>P 標識化プローブを用いて、 $1 \times 10^6$  個の独立したクローンをスクリーニングした。その結果 2 個のクローンを単離し、配列を決定した。これらのクローンの配列決定によって、完全型のヌクレオチド配列 (1294 ~ 1869) が明らかになった。図 1 に示すヌクレオチド配列は少なくとも 3 回の独立した PCR 反応によって確認された。

【0020】

## 結果

リーリンのアフリカツメガエルにおける対応物を得るため、マウス *reelin* の種々の領域に対する数対の縮重 PCR プライマーを設計した。これらのプライマーのうち、F-spondin ドメインと CR-50 エピトープ領域の間の境界を囲むプライマー対は、マウス/ヒト *reelin* に高度に相同な配列を有する断片を増幅した。次に、156 塩基対 (bp) の 5' 末端非コード領域および 1873 bp のコード領域が単離されるように、5' RACE を行い、cDNA ライブラリーをスクリーニングした (図 1A)。これらの配列は、3 つの独立した PCR 産物を配列決定することによって確認された。下等脊椎動物とマウス/ヒトの *Reelin* のアミノ酸配列の比較 (D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Shu-Cheng, C., Soares, H.D., Morgan, J.I. & Curran, T. (1995) *Nature* 374, 719-723.; DeSilva, U., D'Arcangelo, G., Braden, V., Chen, J., Miao, G., Curran, T. & Green, E.D. (1997) *Genome Res.* 7, 157-164.) は、進化において保存された領域を明らかにした。*Xreelin* の推定されるアミノ酸配列は、配列決定した領域の全般にわたってマウス/ヒト *reelin* との間で保存されているが、特に F-spondin ドメインにおいて保存されている。F-spondin ドメイ

ン内の同一性および類似性は、それぞれ93.2% および95.1% と推定される。他方、CR-50 エピトープ領域を含み、F-spondinドメインとReelin repeatsの間に位置するヒンジ領域においては、同一性および類似性はそれぞれ77.2% および84.6% である（図2A、2B）。これらの結果は、F-spondinドメインが機能的に重要であることを強く示唆している。我々はF-spondinドメインのすぐ下流を認識するCR-50 がin vitroおよびin vivoの両方においてReelin機能をブロックすることを以前に報告しているので（Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H. & Mikoshiba, K. (1995) *Neuron* 14, 899-912.; Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M. & Soriano, E. (1997) *Nature* 385, 70-74.; Miyata, T., Nakajima, K., Mikoshiba, K. & Ogawa, M. (1997) *J. Neurosci.* 17, 3599-3609.; Nakajima, K., Mikoshiba, K., Miyata, T., Kudo, C. & Ogawa, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8196-8201.), この知見は特に興味深い。

#### 【0021】

クローン化した領域の下流の配列情報を得るため、3' RACE法を実施した。その結果、F-spondinドメインおよびCR-50 エピトープ領域のみを含むXreelinのランケート型アイソフォームが同定された（図1B、2B）。興味深く、かつ驚くべきことに、この新規なアイソフォームはReelin repeatsを全くもたない。このランケート型アイソフォームにおいては、TGGコドンの第2のヌクレオチドからヌクレオチド配列が完全型のヌクレオチド配列と異なっている。TGGコドンがTAAに変わっているのである。この差異は、433位のアミノ酸（トリプトファン）を終止コドン（TAA）に変える。その後には698 bpの非コード領域が続き、そしてポリアデニル化シグナル（AATAAA）がポリアデニル化部位の15 bp上流に現れる。完全型およびランケート型の間で異なっているヌクレオチドは、マウスreelinのエキソン#11の末端に対応している（Royaux, I., Lambert de Rouvroit, C., D'Arcangelo, G., Demirov, D. & Goffinet, A.M. (1997) *Genomics* 46, 240-250.）。このアイソフォームがいかにして生じるのかはまだ完全に分析されていないが、

最も考えられるのはスプライシングがスキッピングしてイントロン#11 中に読み込まれたという説明である。両方のアイソフォームに対するフォワードプライマーおよびランケート型アイソフォームのみに特異的なリバーズプライマーを用いたPCR増幅を、ゲノムDNAまたはランダムにプライミングされたcDNAのいずれかを鋳型として実施した。これらのPCRは両方とも同一サイズの増幅産物をもたらした。これはスプライシング機構のスキッピングと両立する。

#### 【0022】

##### 〔実施例2〕 ノーザンブロット分析

##### 方法

50期、56期および60期のアフリカツメガエル・オタマジャクシの頭から調製した5 g のpoly(A)+RNA を各レーンにアプライし、電気泳動を行なった後、Zeta-Probe Blotting Membrane (Bio-Rad)に転写した。完全型およびランケート型に共通の配列ならびにランケート型の3'末端非コード領域（それぞれヌクレオチド414～1253および1302～2099に対応する）を用いて、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTP および  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  CTP を用いたin vitro転写によって $^{32}\text{P}$ 標識化RNAプローブを合成した。5xSSPE/50%ホルムアミド、5xデンハート溶液および0.5% SDSを含む緩衝液中で、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを実施した。2xSSCおよび0.1% SDSを含む緩衝液を用いて60℃でフィルターを30分間洗浄し、次に0.1xSSC および0.1% SDSを含む緩衝液を用いて60℃で30分間洗浄した。

#### 【0023】

##### 結果

この新規なアイソフォームの存在を確認するため、ノーザンブロット分析を実施した（図3）。両方の形態に共通する配列に対するRNAプローブを用いて、12～13キロ塩基(kb)の転写産物を検出した。この結果は、アフリカツメガエルには実際、マウスにおけるreelinに類似した巨大分子として完全型のreelinが存在することを示している。この転写産物の他に、2.8 kbの別な転写産物もまた見いだされた。さらに、3'末端非コード領域をプローブとして用いると、2.8 kbの短い方の転写産物のみが検出された。ランケート型は、1299塩基のコード領域および698塩基の3'末端非翻訳領域を有し、またこれまでに5'末端非翻訳領域の156塩

基がクローン化され配列決定されている。したがって、トランケート型の mRNA は少なくとも 2153 塩基のヌクレオチドからなることが予想される。ノーザンブロット分析の結果検出されたバンドのサイズはこれよりも大きい、この不一致は 5' 末端非翻訳領域のまだ同定されていない領域のためであると思われる。したがって、我々はトランケート型の mRNA は確かに存在すると結論する。

## 【0024】

〔実施例 3〕 RT-PCR による、Xreelin mRNA を発現する時期の決定

## 方法

2 細胞期および 7、8、10/11、12.5、13、15、19、22、28、35/36、42 および 50 期の全胚、ならびに成体脳から全 RNA を調製した。1 g の全 RNA を用いて逆転写を実施し、逆転写産物の 1/40 を  $^{32}\text{P}$ -dCTP を用いた PCR にかけた。PCR プライマーは完全型 Xreelin とトランケート型 Xreelin との共通領域内で設計した (5'-TCCCACAACAAACCTAAGTT-3' (配列番号 12) および 5'-ATGTCCTCACTGGAAAGATC-3' (配列番号 13))。対照として、同一の鋳型を用いてヒストン H4 の PCR も実施した (5'-CGGGATAACATTTCAGGGTATCACT-3' (配列番号 14) および 5'-ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT-3' (配列番号 15))。PCR のサイクル数は Xreelin については 24、ヒストン H4 については 19 であった。

## 【0025】

## 結果

転写レベルにおける Xreelin 発現の経時変化を RT-PCR によって測定した (図 4A)。このアッセイに用いたプライマー対は、完全型とトランケート型の間の共通な配列を増幅するように設計された。各サンプルを標準化するため、ヒストン H4 用のプライマー対を用いた PCR を実施した。発生の初期においては Xreelin mRNA は検出されず、この mRNA は後期神経胚 (28 期) において初めて現われた。オタマジャクシの段階では、そのシグナルは神経胚におけるシグナルよりもはるかに強くなった。Xreelin 転写産物は成体の脳にも検出された。マウスの発生においては、reelin mRNA は E8 後に in situ ハイブリダイゼーションによって E8 以降検出可能となり、成体脳において発現され続ける (Ikeda, Y. & Terashima, T. (1997) Dev. Dyn. 210, 157-172.; Schiffmann, S.N., Bernier, B. & Goffinet, A.M



.(1997) European Journal of Neuroscience 9, 1055-1071.; Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L. & Curran, T. (1998) J. Neurosci. 18, 7779-7799.)。アフリカツメガエルの発生における後期神経胚は神経胚形成とCNSの形態発生の間の変換点なので、この段階は神経発生におけるマウス胚のE8に相当する。したがって、Xreelin発現の経時変化はマウスreelinのそれに類似している。

# 【0026】

## 〔実施例4〕完全型及びトランケート型のmRNAの定量

### 方法

完全型及びトランケート型のXreelinの転写産物の量を、遺伝子特異的プライマーおよび5'末端にFAM (5-carboxyfluorescein)を、そして3'末端にTAMRA (N,N,N',N'-tetramethyl-5-carboxyrhodamine)を結合させたオリゴヌクレオチドプローブ(TaqManプローブ)を用いて、ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer)によって評価した。種々の段階(2細胞期、22期、28期および43期の全胚)および50~54期脳の種々の部分から全RNAを調製した(図5C)。Super Script II (Gibco BRL)

およびランダムヘキサマーを用いて、これらのRNAサンプルの1gから逆転写(RT)を実施し、逆転写産物の1/40をTaqManプローブを用いたPCRにかけた。このPCR分析の方法はTaqMan PCR Reagent Kit (Perkin Elmer)のプロトコールに従った。1つの逆転写産物について3つの独立したPCR反応を実施することによって、各点で平均および標準偏差を求めた。完全型Xreelinを検出するため、1対のプライマー(5'-GTCCTGATCTACAAACACCTGCTACT-3'(配列番号16)および5'-AGGTAGCACATGGACAAAATCC-3'(配列番号17))およびTaqManプローブ(5'-(FAM)CTGAGCAAACCGTCACCGTGGTCA(TAMRA)-3'(配列番号18))を用いた。トランケート型Xreelinについては、1対のプライマー(5'-TAGTGAGTGTGACAATCAGAAGTGA-3'(配列番号19)および5'-GGCCCTTTCTGGATAAGAATC-3'(配列番号20))およびTaqManプローブ(5'-(FAM)TCAACCATTGCTCATACAGATGCACA(TAMRA)-3'(配列番号21))を用いた。完全型Xreelinまたはトランケート型Xreelinに特異的な配列を含むプラスミドDNAの連続希釈物から作製した標準曲線によってコピー数を推定した。

## 【0027】

## 結果

次に、我々は完全型Xreelinと比較したトランケート型Xreelinの発生プロフィールを検討した。この問題と取り組むため、完全型およびトランケート型のmRNAの量をいくつかの時点で測定した（図4B）。蛍光染料FAMおよびTAMRAによって5'末端および3'末端を標識したプローブを用いるTaqMan PCR技法によってRNAの量を定量し、PCRの間におけるプローブの分解を観察した。トランケート型Xreelinの発現は28期のあたりで初めて観察され、後の段階ではこのシグナルははるかに強くなった。この発現パターンは完全型Xreelinの発現パターンに類似しており、また完全型Xreelinに対するトランケート型Xreelinの量の比率は発生の全期間を通して5～10%に一定していた。これらの結果は、両形態の絶対量は互いに異なるが、発生における両形態の発現プロフィールは全く同じに調節されていることを示している。

## 【0028】

〔実施例5〕 *in situ*ハイブリダイゼーション法によるXreelin mRNAの局在化の分析

## 方法

SDSに基づく*in situ*ハイブリダイゼーションプロトコール(Shain, D.H. & Zuber, M.X. (1996) J. Biochem. Biophys. Methods 31, 185-188.)を用いた。35/36期の全胚をMEMFA緩衝液(Harland, R.M. in Methods in Cell Biology (1991) (Academic Press Inc., San Diego), pp685-694.)中で90分間固定した。47期の脳をMEMFA中で摘出し、新鮮なMEMFA中で90分間固定した。図1Aの414～1252に対応するヌクレオチド配列を含むプラスミドDNAを鋳型として用いて、*in vitro*転写によってジゴキシゲニン標識化RNAプローブを合成した。Purple AP（ペーリンガー・マンハイム）を用いて、室温で数時間アルカリ性ホスファターゼ発色反応を実施した。70% PBS に溶解した4%パラホルムアルデヒド中で51期の脳を摘出し、新鮮な同一固定液中で一晩固定した。OCT化合物(Tissue Tech)に包埋した標本を厚さ20  $\mu$ m の薄片とし、全胚についても脳についても同じ方法で*in situ*ハイブリダイゼーションに使用した。ただし、発色反応の工程では、全胚については

アルカリ性ホスファターゼ緩衝液に溶解したNBT溶液を、脳については同一緩衝液に溶解したBCIP溶液を使用した。完全型Xreelinおよびトランケート型Xreelinに対するRNAプローブを、図1Aの1296～1825および図1Bの1302～2099に対応する配列からそれぞれ合成した。XdIIおよびエオメソデルミン(eomesodermin)に対するRNAプローブは、51期のアフリカツメガエル・オタマジャクシから調製したcDNAから各遺伝子特異的プライマー (XdIIについては5'-CCTCCAAGTCTGCCTTTATG-3' (配列番号22) および5'-GCGGACAACAATATGCAAGG-3' (配列番号23)、エオメソデルミンについては5'-GCGGACAACAATATGCAAGG-3' (配列番号24) および5'-GTTGTTGACAACTGGTCC-3' (配列番号25)) を用いて得たPCR断片を含むプラスミドより調製した。

【0029】

## 結果

Reelin分子はマウス脳の発生におけるきちんと整列した層構造の形成に必要とされる。アフリカツメガエルにもリーリンの対応物が存在するが、アフリカツメガエルの終脳は明白な層構造を全く示さない。したがって、Xreelinがマウス新皮質の相同物であるアフリカツメガエル背側外套(dorsal pallium)で発現されるかどうかは重要である (Northcutt, G.R. & Kaas, J.H. (1995) Trends Neurosci 18, 373-379.; Fernandez, A.S., Pieau, C., Reperant, J., Boncinelli, E. & Wassef, M. (1998) Development 125, 2099-2111.)。この点を調べるため、終脳におけるXreelin mRNAの分布をより厳密に検討した。XdIIはdistallessのアフリカツメガエル対応物であり (Asano, M., Emori, Y., Saigo, K. & Shiokawa, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 5044-5047.)、線条において発現されることが知られている (Asano, M., Emori, Y., Saigo, K. & Shiokawa, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 5044-5047.)。XdII mRNAは終脳の腹側に局在しており (図5D)、そしてXreelin転写産物はXdII陽性領域よりも背側 (外側外套 lateral pallium) に見いだされる (図5C)。外側外套の背側に位置する背側外套においては、終脳胞の表面に近い少数の分散した細胞でXreelinが弱く発現される。これらの細胞はマウス新皮質中のカハル-レチウス(Cajal-Retzius)細胞に対応し、そして神経芽細胞の多層アライメント以外の形態形成現象において何らかの機能を有し

ている可能性がある。

#### 【0030】

発生中のマウス嗅球においては、*reelin*転写産物は僧帽状細胞で発現される。我々はアフリカツメガエル嗅球における*Xreelin*発現細胞を同定した。エオメソデルミン(*Eomd*)は嗅球の僧帽状細胞で特異的に発現されることが知られている(Ryan, K., Garrett, N., Mitchell, A. & Gurdon, J.B. (1996) *Cell* 87, 989-1000.; Ryan, K., Butler, K., Bellefroid, E. & Gurdon, J.B. (1998) *Mech. Dev.* 75, 167-170.)。Eomdに対するプローブを用いて、我々は僧帽状細胞が51期嗅球の水平切断面上に"V"字型のパターンに配置されていること(図5F)、および*Xreelin*転写産物が同じパターンで検出されること(図5E)を明らかにした。その結果、我々は*Xreelin*は発生中の嗅球の僧帽状細胞で発現されると結論した。

#### 【0031】

脳のホルマウントin situハイブリダイゼーションは、*Xreelin*が蓋で発現されることを明らかにした(図5B)。*Xreelin*発現細胞の局在化を詳細に解明するため、*Xreelin*特異的プローブを用いて54期の蓋の横断面とハイブリダイズさせた。*Xreelin*は、蓋の最も表層に位置する視神経線維層の下に見いだされた(図5B)。視神経線維層を通過してきた網膜軸索は、その下に位置する多細胞層中に入り、特定の板(lamina)サブセットの所で終わる。マウス*reelin* mRNAの上丘における詳細な分布はこれまで報告されていない。しかし、ホモ接合型リーラーマウスは細胞構築それ自体は正常であるが、網膜蓋投射の異常を示す(Frost, D.O., Edwards, M.A., Sachs, G.M. & Caviness, V.J. (1986) *Brain Res* 393, 109-200.)。総合的に考えると、これらのデータは、*Xreelin*は発生中の網膜蓋投射において何らかの役割を有することを示唆している。

#### 【0032】

脊髄においては、*Xreelin*シグナルは最も背側と最も腹側の間にある正中面に対してやや背側に位置する、中間から中間外側部分に主として見いだされる。弱いシグナルは後角にも検出される(図5H)。これらの発現パターンはマウスの発現パターンに類似している(Ikeda, Y. & Terashima, T. (1997) *Dev. Dyn.* 210

, 157-172.; Schiffmann, S.N., Bernier, B. & Goffinet, A.M. (1997) *European Journal of Neuroscience* 9, 1055-1071.; Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L. & Curran, T. (1998) *J. Neurosci.* 18, 7779-7799.)。

### 【0033】

トランケート型Xreelinの局在化を調べるため、トランケート型特異的プローブを用いてin situハイブリダイゼーションを実施した。我々は完全型Xreelin (図6A) に類似したパターンの微かなシグナルを小脳で検出することができた (図6B)。他の領域においてはin situシグナルを検出することはできなかった。そこで、我々はアフリカツメガエル脳の種々の領域由来のRNAを用いて、TaqMan PCR分析を実施した (図6C、6D)。完全型のmRNAが嗅球、蓋および小脳に大量に見いだされ、これはin situ ハイブリダイゼーションによって明らかとなった発現パターンに一致した。他方、トランケート型Xreelinは完全型Xreelinに類似した分布を示し、完全型Xreelinに対するトランケート型の比率はどの領域においても約10%であった。種々の段階から得た結果 (図4B) を考慮すると、両方の形態の発現プロファイルは何らかの共通した機構によって調節されているように思われる。

### 【0034】

【実施例6】 マウスにおけるトランケート型リーリントタンパク質の存在  
操作手順

マウスのトランケート型リーリントタンパク質は、3'-RACEによって、その存在が確認された。胎生18日目のリーラー系統のヘテロ胎児 (遺伝子型はPCRにより特定した) から脊髄を取り出し、ここからtotal RNAを抽出した。5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGAATTCATCTATAGC(T)<sub>17</sub>-3' (配列番号9) のプライマーを用いてFirst strand synthesisを行い、これをAdaptor primer AP2 (5'-CGCGTCGACTAGTACGAATT-3' (配列番号26)) とリーリン遺伝子特異的プライマーRL-11 (5'-CTGATTGGATTCAGCTGGAG-3' (配列番号27)) でPCR、さらにこのPCR産物をAP2とリーリン遺伝子特異的プライマーRL-12 (5'-ATTCAGCCCCACAGAGAAGTC-3' (配列番号28)) でnested PCRを行った。

【0035】

結果

このPCRで3本のバンドを確認し、それぞれpGEM-T Easyベクターに組み込み、Sequenceを行ったところ、その内の一つが、マウスリーリンのexon14までを含むが、その後、未知の配列が続く選択的スプライシング産物であった。この選択的スプライシング産物と完全長リーリントタンパク質の違いはexon14の最後のアミノ酸がセリンからアルギニンに置換し、その次のコドンで終止コドンとなることで、そのため、この選択的スプライシング産物はトランケート型であると特定された。このマウスのトランケート型リーリンの3'非翻訳領域の最後には複数のpoly-adenylation signal (AATAAA) が確認された。

【0036】

【発明の効果】

本発明のトランケート型リーリントタンパク質およびそれをコードするDNAは、神経細胞の配置異常による滑脳症などの疾患の治療に利用できる。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Truncated form of Reelin protein and DNA encoding the same

<130> RJH11-060N

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2274

<212> DNA

<213> *Xenopus laevis*

<220>

<221> CDS

<222> (157)..(1455)

<220>

<221> sig-peptide

<222> (157)..(234)

<220>

<221> misc-feature

<222> (241)..(726)

<223> F-spondin domain

<220>

<221> misc-feature

<222> (847)..(1197)

<223> CR-50 epitope region

<400> 1

cattctactg tcacgttaac ttccatttt cttcacttta actttgaaga atttaaaaaa 60

aaccattaat tatatatatta tataaatata tatatatata ctcgttatcc caggctgctt 120

atgaagaaag ctcattaaga acagtgggac ccagga atg gaa ctg ctc cac acc 174

Met Glu Leu Leu His Thr

1

5

ttc tgc ggt ggg cgc tgg act ttg ctg ctc ttc acg ggg atc ttg tgc 222

Phe Cys Gly Gly Arg Trp Thr Leu Leu Leu Phe Thr Gly Ile Leu Cys

10

15

20

ttt gtt gtt gcc cgc gga gtg ggg tat tat ccc agg ttc tct cca ttc 270

Phe Val Val Ala Arg Gly Val Gly Tyr Tyr Pro Arg Phe Ser Pro Phe

25

30

35

ttt ttc ctt tgc act cat cat gga gaa ctg gaa gga gat ggg gaa caa 318

Phe Phe Leu Cys Thr His His Gly Glu Leu Glu Gly Asp Gly Glu Gln

40

45

50

gga gaa gtg ctc atc tct ctg cac ctg gcg ggc aac ccc agc tac tac 366

Gly Glu Val Leu Ile Ser Leu His Leu Ala Gly Asn Pro Ser Tyr Tyr

55

60

65

70

ata cct ggg cag gag tac cat gtg acc ata tcc act agt acc ttc ttt 414

Ile Pro Gly Gln Glu Tyr His Val Thr Ile Ser Thr Ser Thr Phe Phe

75

80

85

gat ggt ctt ctg gtg act gga ctt tac act tct acc agt gtt caa gcg 462

Asp Gly Leu Leu Val Thr Gly Leu Tyr Thr Ser Thr Ser Val Gln Ala

90

95

100



tct cag agc att gga ggc tct aaa gca ttt gga ttt ggt att atg agc 510

Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Lys Ala Phe Gly Phe Gly Ile Met Ser

105

110

115

gac cgt cag ttt ggt acc cag ttt atg tgc agt gtc gtt gct tcc cac 558

Asp Arg Gln Phe Gly Thr Gln Phe Met Cys Ser Val Val Ala Ser His

120

125

130

gtg agt cat ctt ccc aca aca aac cta agt ttt gta tgg att gca cca 606

Val Ser His Leu Pro Thr Thr Asn Leu Ser Phe Val Trp Ile Ala Pro

135

140

145

150

cca gca ggt aca gga tgt gtc aac ttc atg gcc aca gca aca cat agg 654

Pro Ala Gly Thr Gly Cys Val Asn Phe Met Ala Thr Ala Thr His Arg

155

160

165

gga caa gtt att ttc aag gat gcc ctg gca caa caa ctg tgc gaa caa 702

Gly Gln Val Ile Phe Lys Asp Ala Leu Ala Gln Gln Leu Cys Glu Gln

170

175

180

gga gct cct act gaa gct ccc ttg cgg cct aat tta gcc gaa att cac 750

Gly Ala Pro Thr Glu Ala Pro Leu Arg Pro Asn Leu Ala Glu Ile His

185

190

195

agt gaa agc atc ctt tta cga gat gat ttt gac tca tat aag ctt cag 798

Ser Glu Ser Ile Leu Leu Arg Asp Asp Phe Asp Ser Tyr Lys Leu Gln

200

205

210

gaa ttg aat cca aat att tgg ctc cag tgc aga aat tgc gaa gtt ggt 846  
 Glu Leu Asn Pro Asn Ile Trp Leu Gln Cys Arg Asn Cys Glu Val Gly  
 215 220 225 230

gag cag tgt ggt gca att atg cat ggt ggg gca gtc act ttt tgt gat 894  
 Glu Gln Cys Gly Ala Ile Met His Gly Gly Ala Val Thr Phe Cys Asp  
 235 240 245

ccg tat gga cca aga gaa ttg ata act gtt caa atg aac aca act acg 942  
 Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Ile Thr Val Gln Met Asn Thr Thr Thr  
 250 255 260

gca tct gtt ttg cag ttt tct att ggg tca gga tcg tgc agg ttc agc 990  
 Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser Gly Ser Cys Arg Phe Ser  
 265 270 275

tat tca gac cct gga att gtg gtg tca tac aca aag aat aat tca tct 1038  
 Tyr Ser Asp Pro Gly Ile Val Val Ser Tyr Thr Lys Asn Asn Ser Ser  
 280 285 290

agt tgg atg cca ttg gag aga att agt gct cct tcc aat gtt agc acc 1086  
 Ser Trp Met Pro Leu Glu Arg Ile Ser Ala Pro Ser Asn Val Ser Thr  
 295 300 305 310

atc att cac att att tac cta cct cct gaa gct aaa gga gaa aat gtg 1134  
 Ile Ile His Ile Ile Tyr Leu Pro Pro Glu Ala Lys Gly Glu Asn Val  
 315 320 325

aaa ttc cgt tgg agg cag gag aac atg cag gca ggt gat gtg tat gaa 1182

Lys Phe Arg Trp Arg Gln Glu Asn Met Gln Ala Gly Asp Val Tyr Glu

330

335

340

gcc tgc tgg gca ctg gat aac att ttg att atc aat gct gct cat aaa 1230

Ala Cys Trp Ala Leu Asp Asn Ile Leu Ile Ile Asn Ala Ala His Lys

345

350

355

gaa gtc gtg tta gaa gac aat cta gat cca atg gac aca gga aac tgg 1278

Glu Val Val Leu Glu Asp Asn Leu Asp Pro Met Asp Thr Gly Asn Trp

360

365

370

ctt ttt ttc cct ggg gct act gta aag cat acc tgt cag tcg gat gga 1326

Leu Phe Phe Pro Gly Ala Thr Val Lys His Thr Cys Gln Ser Asp Gly

375

380

385

390

aac tct ata tat ttt cat ggt aca gaa agc agt gaa tac aac ttt gct 1374

Asn Ser Ile Tyr Phe His Gly Thr Glu Ser Ser Glu Tyr Asn Phe Ala

395

400

405

act acc aga gat gtg gat ctt tcc agt gag gac atc cag gac cag tgg 1422

Thr Thr Arg Asp Val Asp Leu Ser Ser Glu Asp Ile Gln Asp Gln Trp

410

415

420

tct gaa gag ttt gag aat cta cca gct ggg taa attttagatg tagccatgag 1475

Ser Glu Glu Phe Glu Asn Leu Pro Ala Gly

425

430

cattacattt tatcacgtga aaatgcaaga aacagtattt atatacatat tttaaaggtc 1535

aatacagaac cctataaatg gcaggtagg gctaccatgt aaatattttt aatgttcata 1595

atgtcatagg tggttaagtat ttacatagc agttactgat tgattattat tgtttgtctt 1655

ttacccagtt acagctaaca cacagggcat tttttccaa tggcaacatc cattttgccg 1715

ctctgagcag aacatttggt tcatttatgg catttgaacc tgtgtctatg agagtgcagc 1775

taaaataaac ttctggcta tgggtgttac catacaacac tggtaacctca tgacatatga 1835

aaaatatgac tcacattaaa tcagtaagat cagttcaagt atagtacggg gcattaatct 1895

gccataaac atttagaatt gtattttata ttttatattt aagattagaa ttgactccat 1955

tcttgtaacct tgcatacat ttgtggctag tttatgggtc aatagacagc catcatacat 2015

tagtcagagt aaatcgagca ttacaaaact caatgagcca tagtgagtgt gacaatcaga 2075

agtgactgtc aagtaaatca accatttgcg catacagatg cacatttgaa cagtggattc 2135

ttatccagaa agggccattt ttactatca ctctgggatt taaatgccac ttctaattgg 2195

aacttccagg tcacaaaaat agaatggaca tttaaacatc atggttctca ttacccttaa 2255

taaaactccg gttttttta 2274

<210> 2

<211> 432

<212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<400> 2

Met Glu Leu Leu His Thr Phe Cys Gly Gly Arg Trp Thr Leu Leu Leu

1

5

10

15

Phe Thr Gly Ile Leu Cys Phe Val Val Ala Arg Gly Val Gly Tyr Tyr

20

25

30

Pro Arg Phe Ser Pro Phe Phe Phe Leu Cys Thr His His Gly Glu Leu

35

40

45

Glu Gly Asp Gly Glu Gln Gly Glu Val Leu Ile Ser Leu His Leu Ala

50

55

60

Gly Asn Pro Ser Tyr Tyr Ile Pro Gly Gln Glu Tyr His Val Thr Ile

65

70

75

80

Ser Thr Ser Thr Phe Phe Asp Gly Leu Leu Val Thr Gly Leu Tyr Thr

85

90

95

Ser Thr Ser Val Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Lys Ala Phe

100

105

110

Gly Phe Gly Ile Met Ser Asp Arg Gln Phe Gly Thr Gln Phe Met Cys

115

120

125

Ser Val Val Ala Ser His Val Ser His Leu Pro Thr Thr Asn Leu Ser

130	135	140
Phe Val Trp Ile Ala Pro Pro Ala Gly Thr Gly Cys Val Asn Phe Met		
145	150	155
Ala Thr Ala Thr His Arg Gly Gln Val Ile Phe Lys Asp Ala Leu Ala		
165	170	175
Gln Gln Leu Cys Glu Gln Gly Ala Pro Thr Glu Ala Pro Leu Arg Pro		
180	185	190
Asn Leu Ala Glu Ile His Ser Glu Ser Ile Leu Leu Arg Asp Asp Phe		
195	200	205
Asp Ser Tyr Lys Leu Gln Glu Leu Asn Pro Asn Ile Trp Leu Gln Cys		
210	215	220
Arg Asn Cys Glu Val Gly Glu Gln Cys Gly Ala Ile Met His Gly Gly		
225	230	235
Ala Val Thr Phe Cys Asp Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Ile Thr Val		
245	250	255
Gln Met Asn Thr Thr Thr Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser		
260	265	270
Gly Ser Cys Arg Phe Ser Tyr Ser Asp Pro Gly Ile Val Val Ser Tyr		
275	280	285

Thr Lys Asn Asn Ser Ser Ser Trp Met Pro Leu Glu Arg Ile Ser Ala  
290 295 300

Pro Ser Asn Val Ser Thr Ile Ile His Ile Ile Tyr Leu Pro Pro Glu  
305 310 315 320

Ala Lys Gly Glu Asn Val Lys Phe Arg Trp Arg Gln Glu Asn Met Gln  
325 330 335

Ala Gly Asp Val Tyr Glu Ala Cys Trp Ala Leu Asp Asn Ile Leu Ile  
340 345 350

Ile Asn Ala Ala His Lys Glu Val Val Leu Glu Asp Asn Leu Asp Pro  
355 360 365

Met Asp Thr Gly Asn Trp Leu Phe Phe Pro Gly Ala Thr Val Lys His  
370 375 380

Thr Cys Gln Ser Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Phe His Gly Thr Glu Ser  
385 390 395 400

Ser Glu Tyr Asn Phe Ala Thr Thr Arg Asp Val Asp Leu Ser Ser Glu  
405 410 415

Asp Ile Gln Asp Gln Trp Ser Glu Glu Phe Glu Asn Leu Pro Ala Gly  
420 425 430

<210> 3

<211> 2745

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (283)..(2052)

<220>

<221> sig-peptide

<222> (283)..(363)

<220>

<221> misc-feature

<222> (284)..(849)

<223> F-spondin domain

<220>

<221> misc-feature

<222> (970)..(1320)

<223> CR-50 epitope region

<400> 3

ggggcgctcgc gtgcacaccg gcggcggcgg cgctcggagg cggacgacgc gctctcggcg 60

cccgcggccc cggttcccc cgcgctctcg ctccggcggc ccaaagtaac ttcgggagcc 120

tcggtctccc gctaacttcc cccgcgggc tcggttcccc ggacccgctc ggctcgagcc 180



cgccgccggc tcgccttccc cgcacgcggc tcctccgtgc cggcgcctcc gaaagtggat 240

gagagagcgc gcggggcgcg cggcggcacg gagcgcggcg gc atg gag cgc ggc 294

Met Glu Arg Gly

1

tgc tgg gcg ccg cgg gct ctc gtc ctg gcc gtg ctg ctg ctg ctg ggc 342

Cys Trp Ala Pro Arg Ala Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala

5

10

15

20

acg ctg agg gcg cgc gcg gcc acc ggc tac tac ccg cgc ttc tcg cct 390

Thr Leu Arg Ala Arg Ala Ala Thr Gly Tyr Tyr Pro Arg Phe Ser Pro

25

30

35

ttc ttt ttc ctg tgc acc cac cac ggg gag ctg gaa ggg gat ggg gag 438

Phe Phe Phe Leu Cys Thr His His Gly Glu Leu Glu Gly Asp Gly Glu

40

45

50

cag ggc gag gtg ctc att tcc ctg cac att gcg ggc aac ccc acc tac 486

Gln Gly Glu Val Leu Ile Ser Leu His Ile Ala Gly Asn Pro Thr Tyr

55

60

65

tac gta ccg gga cag gaa tac cat gtt aca att tca aca agc acc ttc 534

Tyr Val Pro Gly Gln Glu Tyr His Val Thr Ile Ser Thr Ser Thr Phe

70

75

80

ttt gat ggc ttg ctg gtg acg gga ctc tat acc tcg aca agc atc cag 582

Phe Asp Gly Leu Leu Val Thr Gly Leu Tyr Thr Ser Thr Ser Ile Gln

85

90

95

100

tct tct cag agc att gga ggc tcc agc gcc ttt gga ttc ggg atc atg 630

Ser Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Ser Ala Phe Gly Phe Gly Ile Met

105

110

115

tcc gac cac cag ttt ggt aac cag ttt atg tgc agt gtg gtg gcc tct 678

Ser Asp His Gln Phe Gly Asn Gln Phe Met Cys Ser Val Val Ala Ser

120

125

130

cat gtg agt cac ctg cct aca acc aac ctc agc ttt gtc tgg att gcc 726

His Val Ser His Leu Pro Thr Thr Asn Leu Ser Phe Val Trp Ile Ala

135

140

145

cca cca gct ggc aca ggc tgt gtg aat ttc atg gct act gca aca cat 774

Pro Pro Ala Gly Thr Gly Cys Val Asn Phe Met Ala Thr Ala Thr His

150

155

160

agg ggc cag gtg att ttc aaa gac gca ctg gcc cag cag ctg tgt gaa 822

Arg Gly Gln Val Ile Phe Lys Asp Ala Leu Ala Gln Gln Leu Cys Glu

165

170

175

180

caa gga gct ccc aca gag gcc act gct tac tcg cac ctt gct gaa ata 870

Gln Gly Ala Pro Thr Glu Ala Thr Ala Tyr Ser His Leu Ala Glu Ile

185

190

195

cac agt gac agt gtg atc cta cga gat gac ttt gac tcc tac cag caa 918

His Ser Asp Ser Val Ile Leu Arg Asp Asp Phe Asp Ser Tyr Gln Gln

200

205

210

ctg gaa ttg aac ccc aac ata tgg gtt gaa tgc agc aac tgt gag atg 966  
Leu Glu Leu Asn Pro Asn Ile Trp Val Glu Cys Ser Asn Cys Glu Met

215

220

225

gga gag cag tgt ggc acc atc atg cat ggc aat gct gtc acc ttc tgt 1014  
Gly Glu Gln Cys Gly Thr Ile Met His Gly Asn Ala Val Thr Phe Cys

230

235

240

gag ccg tac ggc cct cga gag ctg acc acc aca tgc ctg aac aca aca 1062  
Glu Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Thr Thr Thr Cys Leu Asn Thr Thr

245

250

255

260

aca gca tct gtc ctc cag ttt tcc att ggg tca gga tca tgt cga ttt 1110  
Thr Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser Gly Ser Cys Arg Phe

265

270

275

agt tac tct gac ccc agc atc act gtg tca tac gcc aag aac aat acc 1158  
Ser Tyr Ser Asp Pro Ser Ile Thr Val Ser Tyr Ala Lys Asn Asn Thr

280

285

290

gct gat tgg att cag ctg gag aaa att aga gcc cct tcc aat gtg agc 1206  
Ala Asp Trp Ile Gln Leu Glu Lys Ile Arg Ala Pro Ser Asn Val Ser

295

300

305

aca gtc atc cac atc ctg tac ctc ccc gag gaa gcc aaa ggg gag agc 1254  
Thr Val Ile His Ile Leu Tyr Leu Pro Glu Glu Ala Lys Gly Glu Ser

310

315

320

gtg cag ttc cag tgg aaa cag gac agc ctg cga gtg ggt gag gtg tat 1302

Val Gln Phe Gln Trp Lys Gln Asp Ser Leu Arg Val Gly Glu Val Tyr

325 330 335 340

gag gcc tgc tgg gcc ctg gat aac atc ctg gtc atc aat tca gcc cac 1350

Glu Ala Cys Trp Ala Leu Asp Asn Ile Leu Val Ile Asn Ser Ala His

345 350 355

aga gaa gtc gtt ctg gag gac aac ctc gac ccg gtc gac acg ggc aac 1398

Arg Glu Val Val Leu Glu Asp Asn Leu Asp Pro Val Asp Thr Gly Asn

360 365 370

tgg ctc ttc ttc cct gga gca acg gtc aag cat agc tgt cag tca gat 1446

Trp Leu Phe Phe Pro Gly Ala Thr Val Lys His Ser Cys Gln Ser Asp

375 380 385

ggg aac tcc att tat ttc cat gga aat gaa ggc agc gag ttc aat ttt 1494

Gly Asn Ser Ile Tyr Phe His Gly Asn Glu Gly Ser Glu Phe Asn Phe

390 395 400

gcc acc acc cgg gat gta gat ctt tct aca gag gat att caa gag cag 1542

Ala Thr Thr Arg Asp Val Asp Leu Ser Thr Glu Asp Ile Gln Glu Gln

405 410 415 420

tgg tca gaa gaa ttt gag agc cag ccc aca gga tgg gat atc ttg gga 1590

Trp Ser Glu Glu Phe Glu Ser Gln Pro Thr Gly Trp Asp Ile Leu Gly

425 430 435

gca gta gtt ggt gca gac tgt gga acc gta gaa tca gga cta tca ctg 1638

Ala Val Val Gly Ala Asp Cys Gly Thr Val Glu Ser Gly Leu Ser Leu

440	445	450	
gtg ttc ctc aaa gat gga gag agg aag ctt tgc acc ccc tac atg gat			1686
Val Phe Leu Lys Asp Gly Glu Arg Lys Leu Cys Thr Pro Tyr Met Asp			
455	460	465	
aca act ggt tat ggc aac ctg agg ttc tac ttc gtt atg gga gga atc			1734
Thr Thr Gly Tyr Gly Asn Leu Arg Phe Tyr Phe Val Met Gly Gly Ile			
470	475	480	
tgt gac cct gga gtc tct cat gaa aac gat atc atc tta tat gca aag			1782
Cys Asp Pro Gly Val Ser His Glu Asn Asp Ile Ile Leu Tyr Ala Lys			
485	490	495	500
att gaa gga aga aaa gaa cac att gca ctg gac act ctt acc tat tct			1830
Ile Glu Gly Arg Lys Glu His Ile Ala Leu Asp Thr Leu Thr Tyr Ser			
505	510	515	
tcc tat aag gtt ccg tct ttg gtt tct gtg gtc atc aac cct gaa ctt			1878
Ser Tyr Lys Val Pro Ser Leu Val Ser Val Val Ile Asn Pro Glu Leu			
520	525	530	
cag aca cct gcc acc aaa ttt tgt ctc agg caa aag agc cac caa ggg			1926
Gln Thr Pro Ala Thr Lys Phe Cys Leu Arg Gln Lys Ser His Gln Gly			
535	540	545	
tat aat cgg aat gtc tgg gct gtg gac ttc ttc cat gtg ctg ccc gtt			1974
Tyr Asn Arg Asn Val Trp Ala Val Asp Phe Phe His Val Leu Pro Val			
550	555	560	

ctc cct tca aca atg tct cac atg atc cag ttt tct att aat ttg gga 2022

Leu Pro Ser Thr Met Ser His Met Ile Gln Phe Ser Ile Asn Leu Gly

565

570

575

580

tgc ggc aca cac cag cct ggg aac agg tga gaagcatgcc gagtgtccta 2072

Cys Gly Thr His Gln Pro Gly Asn Arg

585

590

acatggtagg aaataaacac atgcactgga ccattgaagt aagtttgtca gtaggatttt 2132

tggatgggat tttaacaaaa tatccattaa gaaaatacag attcctactc cctccctaaa 2192

agagtctttt ggtaataaaa tagaagggat gtgactgggt agatttttag gtagaatag 2252

tttcattcag ggagcttgat acaagttatc agaggtgttc accatgctgt gtggcagcat 2312

ccccgttct aacagattgc tgggtgaaga tgactgaaga caagattggc ttctgttggc 2372

tggtgacccc ttataatagg tatggaagtc aattagcact tcaagggcta tgacttctct 2432

gtcctcttg cataagtgtt gtccecatcc tctgtaaaga actttgctga cctcacattc 2492

acaggatgaa gtgacagtgt gagacatggt aattgcctag ctatctatca aattcaagag 2552

cacaaaccca gtttactgtg tattgtcctt cagacgtagc ttttatggca gtaatccaat 2612

ggcttgcctt ctgaaggctg gtcaggcttc agtgagagat gacacattta gtaaaggtct 2672

tagagaaatc ccacattcat cgactcattc aaggtattta gctagaaata aaaagaatca 2732

aaaaaataaa tta

2745

<210> 4

<211> 589

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Glu Arg Gly Cys Trp Ala Pro Arg Ala Leu Val Leu Ala Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Arg Ala Arg Ala Ala Thr Gly Tyr Tyr Pro

20 25 30

Arg Phe Ser Pro Phe Phe Phe Leu Cys Thr His His Gly Glu Leu Glu

35 40 45

Gly Asp Gly Glu Gln Gly Glu Val Leu Ile Ser Leu His Ile Ala Gly

50 55 60

Asn Pro Thr Tyr Tyr Val Pro Gly Gln Glu Tyr His Val Thr Ile Ser

65 70 75 80

Thr Ser Thr Phe Phe Asp Gly Leu Leu Val Thr Gly Leu Tyr Thr Ser

85 90 95

Thr Ser Ile Gln Ser Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Ser Ala Phe Gly  
100 105 110

Phe Gly Ile Met Ser Asp His Gln Phe Gly Asn Gln Phe Met Cys Ser  
115 120 125

Val Val Ala Ser His Val Ser His Leu Pro Thr Thr Asn Leu Ser Phe  
130 135 140

Val Trp Ile Ala Pro Pro Ala Gly Thr Gly Cys Val Asn Phe Met Ala  
145 150 155 160

Thr Ala Thr His Arg Gly Gln Val Ile Phe Lys Asp Ala Leu Ala Gln  
165 170 175

Gln Leu Cys Glu Gln Gly Ala Pro Thr Glu Ala Thr Ala Tyr Ser His  
180 185 190

Leu Ala Glu Ile His Ser Asp Ser Val Ile Leu Arg Asp Asp Phe Asp  
195 200 205

Ser Tyr Gln Gln Leu Glu Leu Asn Pro Asn Ile Trp Val Glu Cys Ser  
210 215 220

Asn Cys Glu Met Gly Glu Gln Cys Gly Thr Ile Met His Gly Asn Ala  
225 230 235 240

Val Thr Phe Cys Glu Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Thr Thr Thr Cys  
245 250 255



Leu Asn Thr Thr Thr Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser Gly  
260 265 270

Ser Cys Arg Phe Ser Tyr Ser Asp Pro Ser Ile Thr Val Ser Tyr Ala  
275 280 285

Lys Asn Asn Thr Ala Asp Trp Ile Gln Leu Glu Lys Ile Arg Ala Pro  
290 295 300

Ser Asn Val Ser Thr Val Ile His Ile Leu Tyr Leu Pro Glu Glu Ala  
305 310 315 320

Lys Gly Glu Ser Val Gln Phe Gln Trp Lys Gln Asp Ser Leu Arg Val  
325 330 335

Gly Glu Val Tyr Glu Ala Cys Trp Ala Leu Asp Asn Ile Leu Val Ile  
340 345 350

Asn Ser Ala His Arg Glu Val Val Leu Glu Asp Asn Leu Asp Pro Val  
355 360 365

Asp Thr Gly Asn Trp Leu Phe Phe Pro Gly Ala Thr Val Lys His Ser  
370 375 380

Cys Gln Ser Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Phe His Gly Asn Glu Gly Ser  
385 390 395 400

Glu Phe Asn Phe Ala Thr Thr Arg Asp Val Asp Leu Ser Thr Glu Asp

405	410	415
Ile Gln Glu Gln Trp Ser Glu Glu Phe Glu Ser Gln Pro Thr Gly Trp		
420	425	430
Asp Ile Leu Gly Ala Val Val Gly Ala Asp Cys Gly Thr Val Glu Ser		
435	440	445
Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Lys Asp Gly Glu Arg Lys Leu Cys Thr		
450	455	460
Pro Tyr Met Asp Thr Thr Gly Tyr Gly Asn Leu Arg Phe Tyr Phe Val		
465	470	475
Met Gly Gly Ile Cys Asp Pro Gly Val Ser His Glu Asn Asp Ile Ile		
485	490	495
Leu Tyr Ala Lys Ile Glu Gly Arg Lys Glu His Ile Ala Leu Asp Thr		
500	505	510
Leu Thr Tyr Ser Ser Tyr Lys Val Pro Ser Leu Val Ser Val Val Ile		
515	520	525
Asn Pro Glu Leu Gln Thr Pro Ala Thr Lys Phe Cys Leu Arg Gln Lys		
530	535	540
Ser His Gln Gly Tyr Asn Arg Asn Val Trp Ala Val Asp Phe Phe His		
545	550	555
		560

Val Leu Pro Val Leu Pro Ser Thr Met Ser His Met Ile Gln Phe Ser

565

570

575

Ile Asn Leu Gly Cys Gly Thr His Gln Pro Gly Asn Arg

580

585

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> modified-base

<222> (8)

<223> i

<400> 5

arttyggnaa ycarttyatg tg

22

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

tgytcccat ycartt

16

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

atgtcctcac tggaaagatc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

cagcaacaca taggggacaa

20

<210> 9

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

ggccacgcgt cgactagtac gaattcatct atagcttttt tttttttttt t 51

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

cagtgtcgtt gcttcccacg tgagtcacat tccca 35

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

cgacaggtac aggatgtgtc aacttcattg ccaca

35

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

tcccacaaca aacctaagtt

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

atgtcctcac tggaaagatc

20

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 14

cgggataaca ttcagggtat cact

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 15

atccatggcg gtaactgtct tcct

24

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 16

gtcctgatct acaaacacct gctact

26

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 17

aggtagcaca tggacaaaat cc

22

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 18

ctgaagcaaa ccagtcaccg tgggtca

26

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 19

tagtgagtgt gacaatcaga agtga

25

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 20

ggccctttct ggataagaat c

21

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 21

tcaaccattt gtcatacag atgcaca

27

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 22

cctccaagtc tgcctttatg

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 23

gcggacaaca atatgcaagg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 24

gcggacaaca atatgcaagg

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 25

ggttggtgac aaactggtcc

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 26

cgcgctcgact agtacgaatt

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 27

ctgattggat tcagctggag

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 28

attcagccca cagagaagtc

20

【0038】

【配列表フリーテキスト】

配列番号5～17、19、20、および22～28は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号18および21は、プローブの塩基配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】

アフリカツメガエルリーリントタンパク質 (Xreelin) の完全型のタンパク質 (A) およびトランケート型アイソフォーム (B) のヌクレオチド配列およびアフリカツメガエルリーリントタンパク質の推定アミノ酸配列を示す。\*は停止コドンを表す。矢じり (▼) で示した領域内のアミノ酸は、完全型のリーリントタンパク質には含まれるが、トランケート型アイソフォームには含まれない。ポリアデニル化部位から15ヌクレオチド上流のポリアデニル化シグナルに下線を引いた。

【図2】

Aは、アフリカツメガエル (Xenopus)、マウス (mouse) およびヒト (human) リーリントタンパク質の推定アミノ酸のマルチプルアラインメントを示す。Signalase ソフトで予想された推定シグナルペプチドに破線を引いた。F-spondin ドメインには太線を引いた。3種すべての間でアミノ酸残基が共通な領域は枠で囲った。挿入したギャップは-で示した。Xreelin と同一のアミノ酸残基は・で示した。

Bは、マウスリーリントタンパク質、Xreelin およびトランケート型Xreelin の模式図を示す。定義されていない領域は破線で示す。枠で囲った領域はコード領域

で、線は非コード領域である。

【図 3】

Aは、Xreelinのノーザンブロット解析の結果を示す。太い矢印(←)は完全型のリーリントタンパク質を示し、矢じり

(◀)

はトランケート型のリーリントタンパク質を示す。

Bは、Xreelinのウェスタンブロット解析の結果を示す。太い矢印(←)は、リーリントタンパク質抗体142で検出された、マウスリーリントタンパク質と同じサイズのXreelinタンパク質を示す。細い矢印(←)は、メタロプロテイナーゼでプロセシングされた、マウスリーリントタンパク質フラグメントよりわずかに小さいサイズのXreelinタンパク質フラグメントを示す。矢じり

(◀)

はトランケート型のリーリントタンパク質と予想されるサイズのタンパク質を示す。

【図 4】

種々の発生段階のRNAサンプルを用いて、RT-PCRを行った結果を示す。各レーンのサンプルの発生段階の番号をパネルの一番上に示す。

【図 5】

完全型Xreelin mRNAの分布をin situ ハイブリダイゼーションで調べた結果を示す(図 5 A、B、C、D、E、F)。終脳における線条の領域および嗅球における僧帽状細胞を明確にするため、XdII (D)およびエオメソデルミン(F)に対するアンチセンスプローブもまた使用した。実験に用いたサンプルは、(A) 35/36期の全胚；(B) 47期の全脳；(E、F) 51期の嗅球の水平切断切片；ならびに (C、D)終脳、(G) 蓋および(H) 脊髄のレベルで切断した54期の冠状切片であった。a:アンチセンスプローブ、cp: 小脳原基、ob: 嗅球、s:センスプローブ、tec:蓋。縮尺線: A, B 500  $\mu$ m; C, D, G, H 100  $\mu$ m; E, F 200  $\mu$ m。

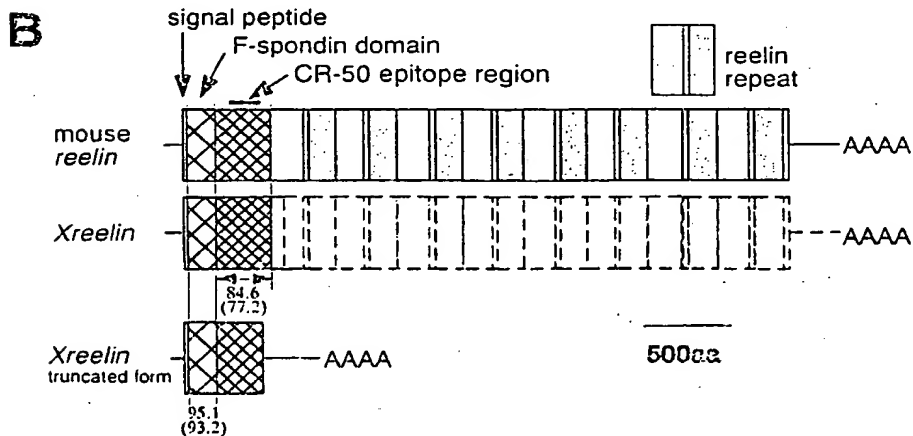
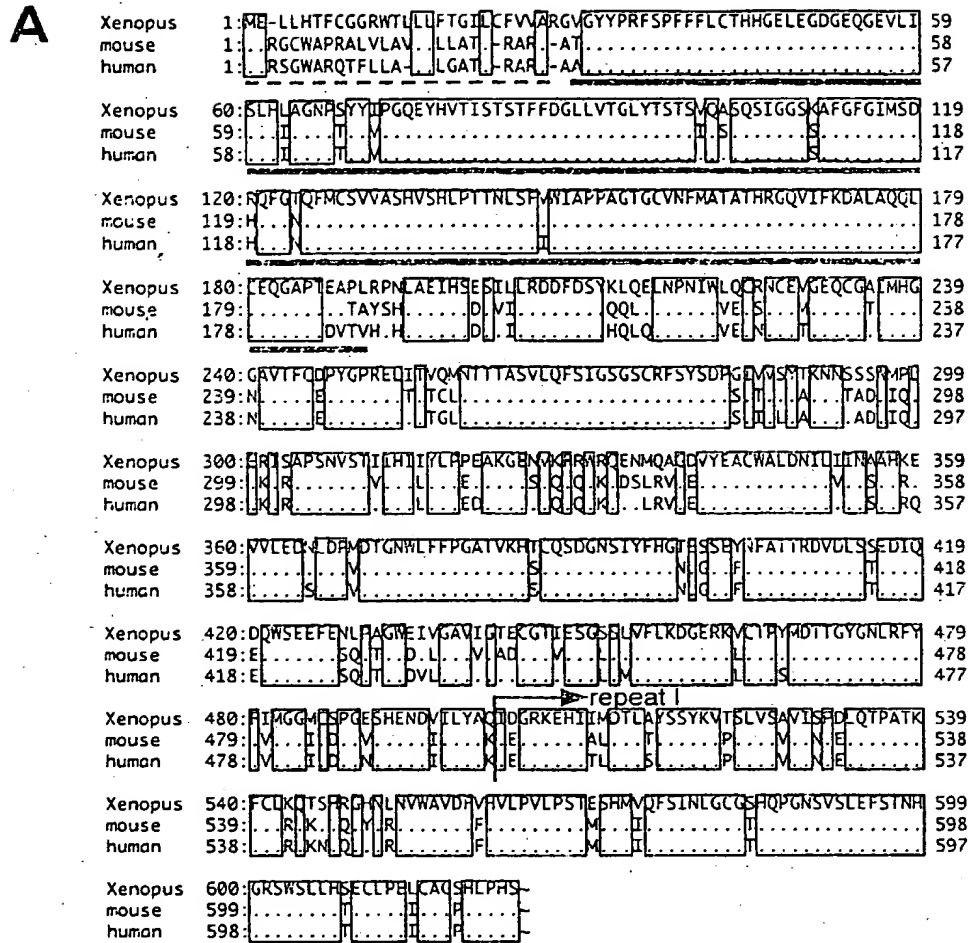
【図 6】

完全型Xreelin mRNAとトランケート型Xreelin mRNAの発現パターンをin situ ハイブリダイゼーション(A~C)およびTaqMan PCR分析(D)によって比較した結果を示す。51期小脳の水平切断切片中に、完全型Xreelin mRNA (A)およびトランケート型Xreelin mRNA (B)が検出された。近隣の切片を完全型Xreelinのセンスプローブとハイブリダイズさせた(C)。縮尺線: 100  $\mu$ m。アフリカツメガエル脳(E)の7つの部分由来の全RNAをTaqMan PCR分析にかけた。白抜きの棒および黒く塗った棒は、完全型Xreelin mRNAおよびトランケート型Xreelin mRNAのコピー数をそれぞれ示す。

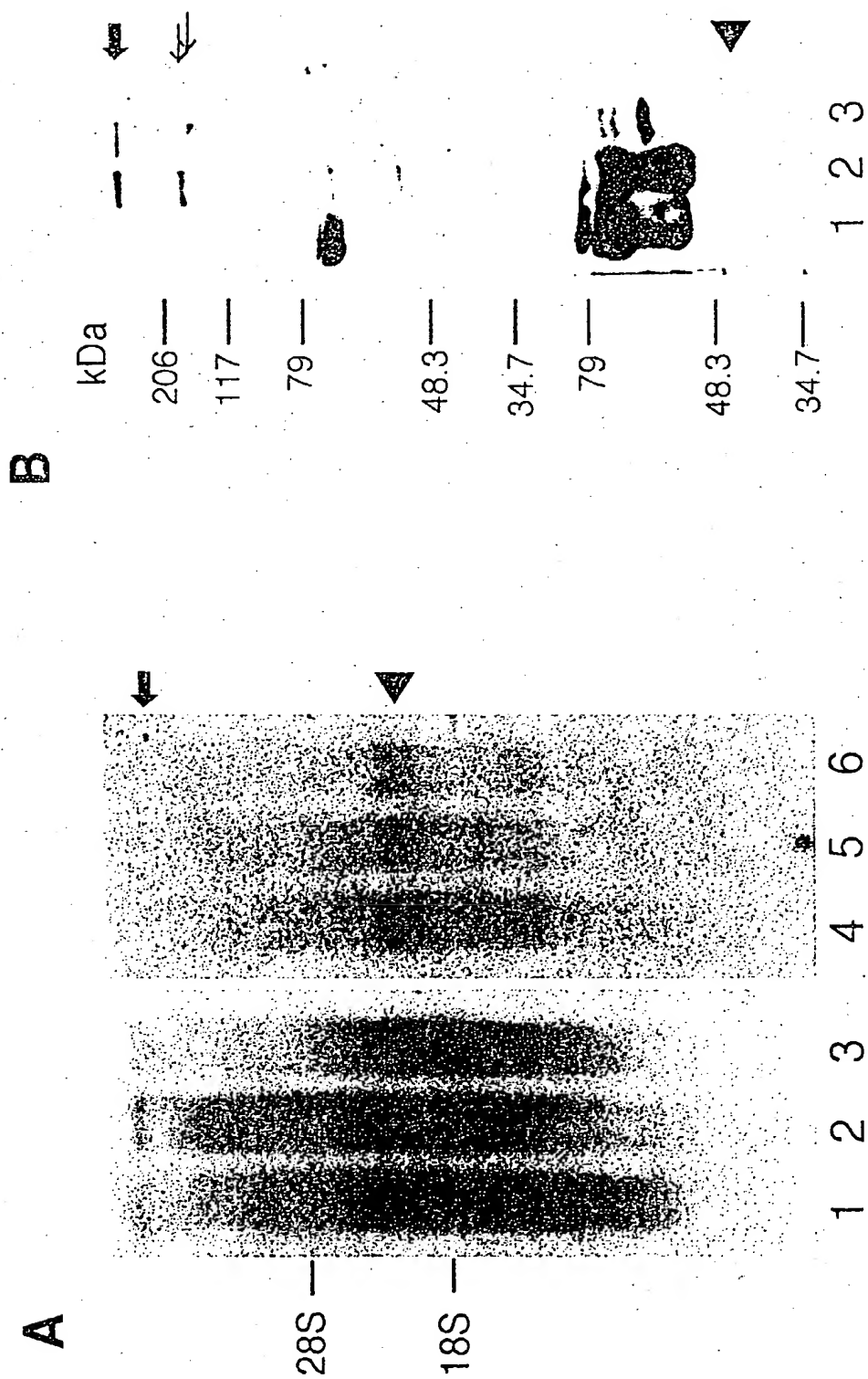




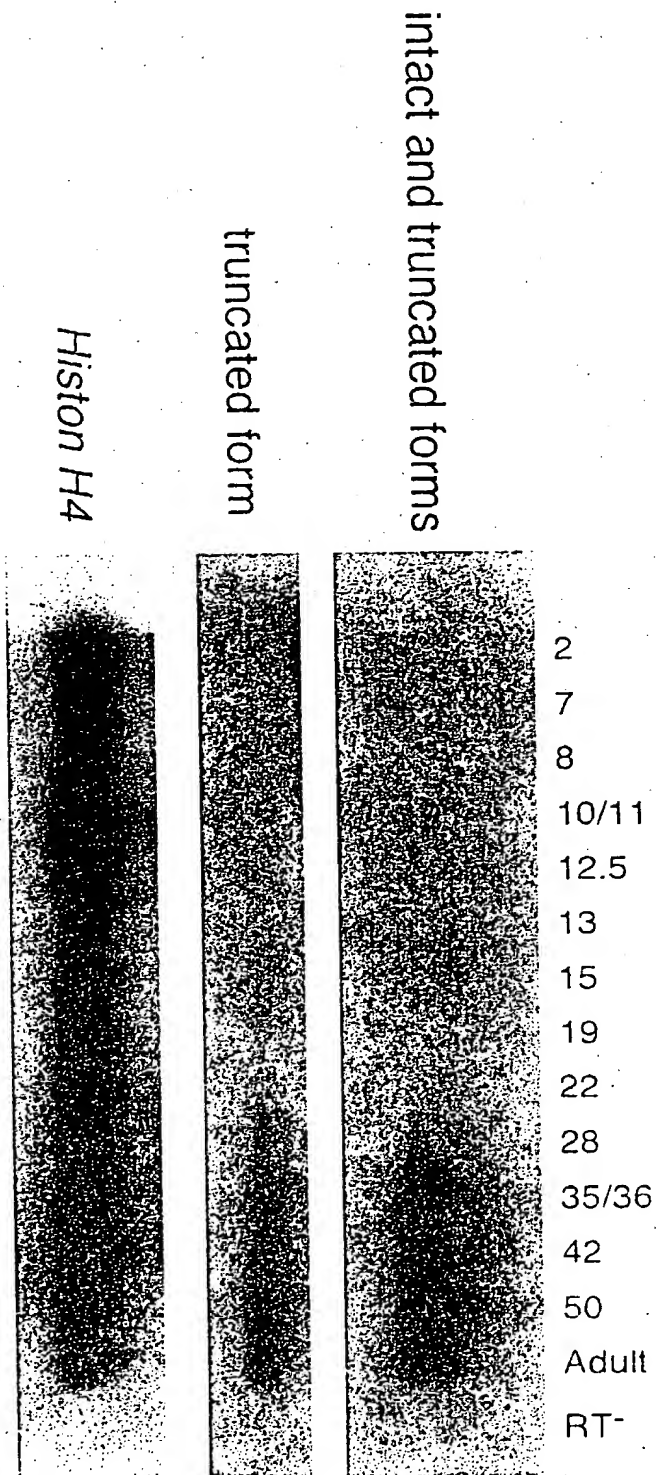
【図2】



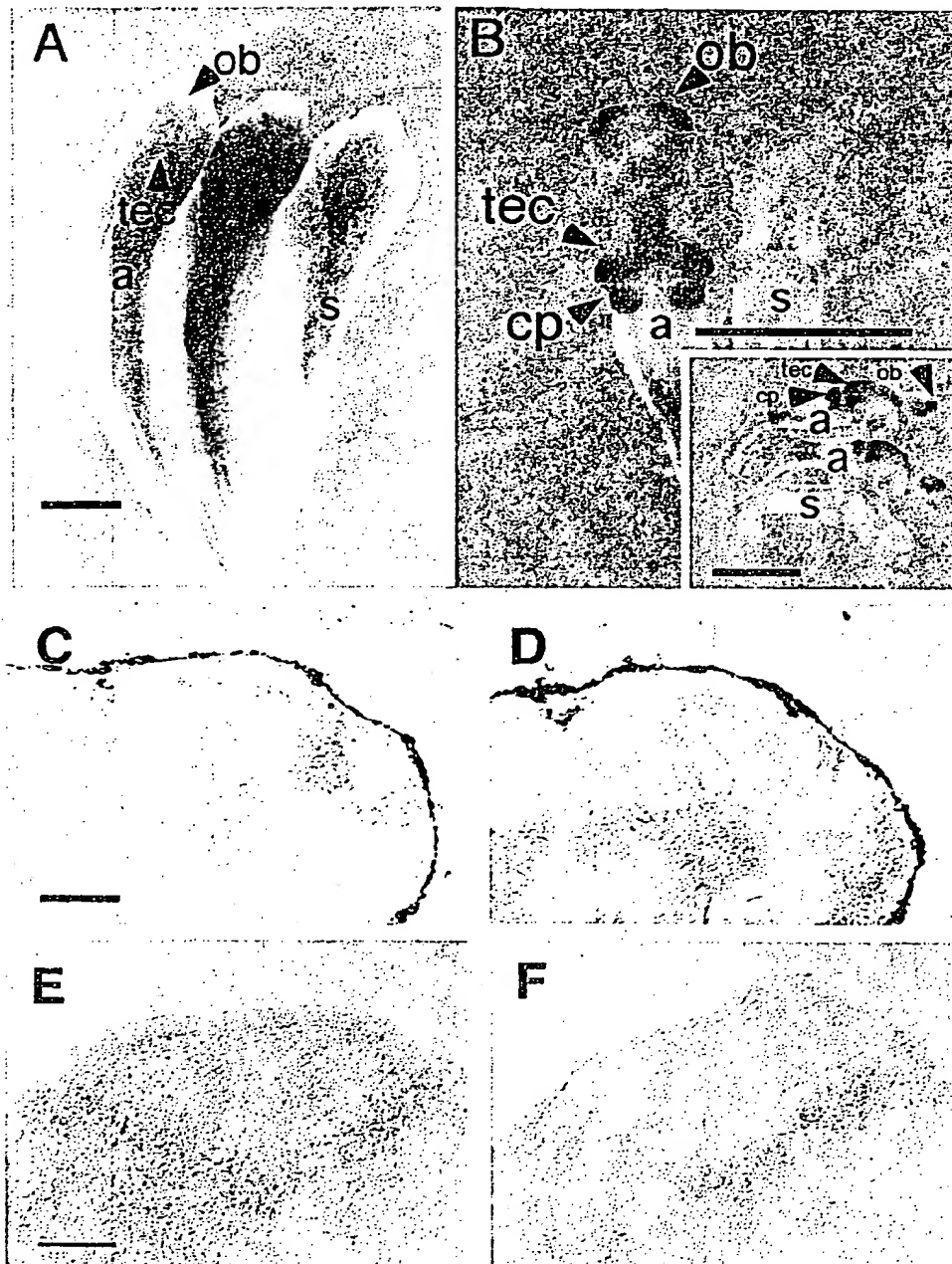
【図 3】



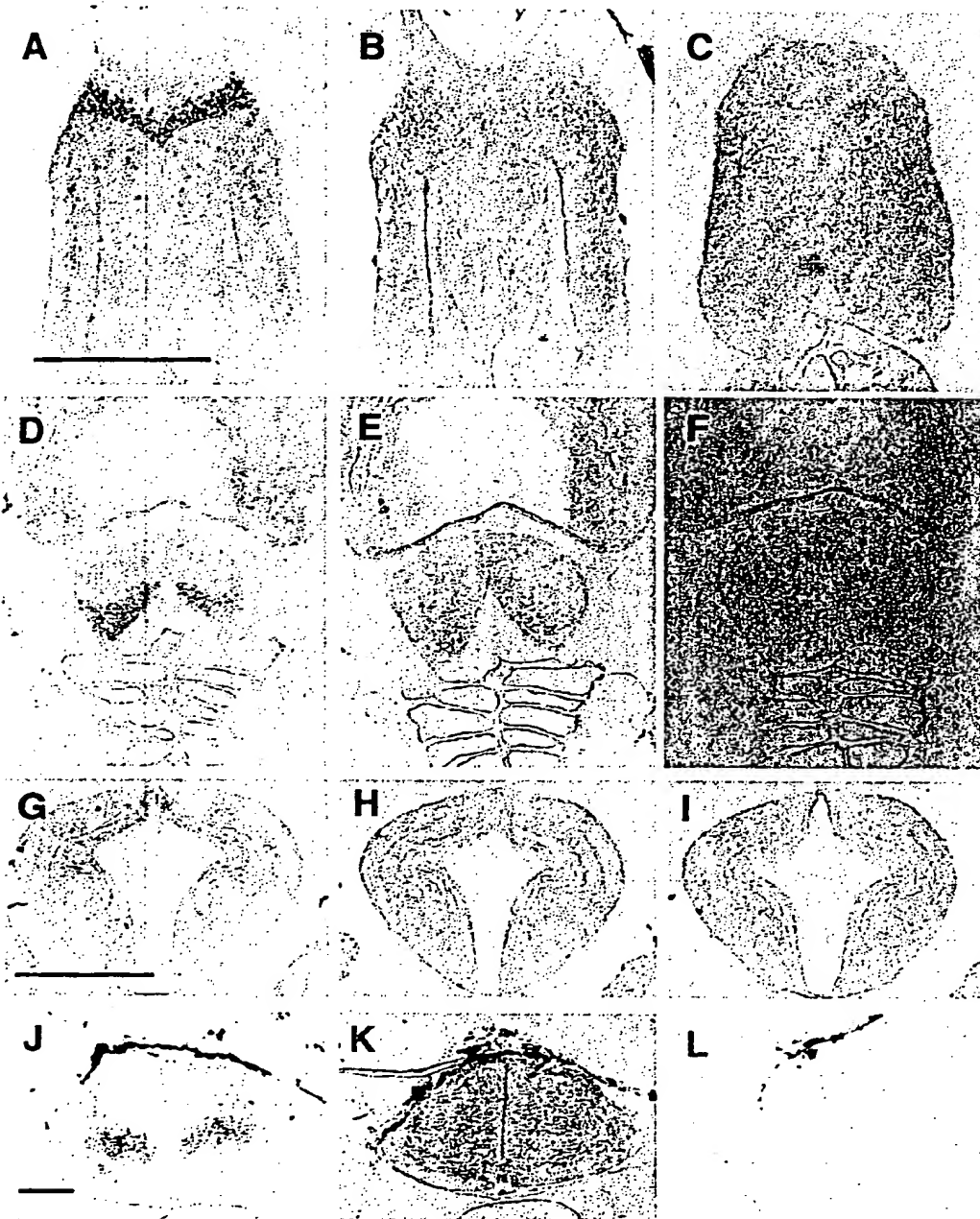
【図 4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 リーリントタンパク質のF-spondinドメインおよびCR-50認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリントタンパク質およびそれをコードするDNA。

【効果】 本発明のトランケート型リーリントタンパク質およびそれをコードするDNAは、神経細胞の配置異常による滑脳症などの疾患の治療に利用できる。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【整理番号】 RJH11-060N  
【提出日】 平成12年 6月29日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-109954

【補正をする者】

【識別番号】 392017978

【氏名又は名称】 御子柴 克彦

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 委任状

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 1

(A)10001220047



## 委 任 状

平成 12 年 6 月 22 日

私は、識別番号 100091096 弁理士 平 木 祐 輔 氏を以って  
100096183 石 井 貞 次  
100098121 間 山 世 津 子  
代理人として下記事項を委任します。

### 記

#### 1. 特 許 出 願



に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 願 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並びにその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切。

4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。

5. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護商標）登録に対する登録異議の申立てに関する手続。

6. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。

7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。

8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 東京都三鷹市井の頭 2-19-25

氏 名 御子柴 寛孝





認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-109954
受付番号	10001220047
書類名	手続補正書
担当官	仲村 百合子 1730
作成日	平成12年 8月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 埼玉県和光市広沢2番1号  
氏 名 理化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [392017978]

1. 変更年月日 1992年 5月29日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都三鷹市井の頭2-19-25  
氏 名 御子柴 克彦